

EP 875 567 B3

Myc-binding zinc finger proteins, their preparation and their usePatent Number: US6160091

Publication date: 2000-12-12

Inventor(s): EILERS MARTIN (DE); PEUKERT KAREN (DE); HAENEL FRANK (DE)

Applicant(s): PROLIFIX LTD (GB)

Requested Patent: EP0875567, A3

Application Number: US19980063035 19980421

Priority Number(s): DE19971018249 19970430

IPC Classification: C07K14/47

EC Classification: C07K14/47

Equivalents: DE19718249, JP11001498

Abstract

Novel Myc-binding zinc finger proteins, their preparation and their use are provided.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 875 567 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
04.11.1998 Patentblatt 1998/45
(21) Anmeldenummer: 98106426.4
(22) Anmeldetag: 08.04.1998

(51) Int. Cl. 6: C12N 15/12, C07K 14/47,
C12N 15/63, C12N 1/21,
G01N 33/68, C07K 16/18,
A61K 48/00

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI
(30) Priorität: 30.04.1997 DE 19718249
(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• Peukert, Karen
35094 Lahntal-Sterzhausen (DE)
• Haenel, Frank, Dr.
07745 Jena (DE)
• Ellers, Martin, Prof. Dr.
35043 Marburg-Cappel (DE)

(54) **Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, Ihre Herstellung und ihre Verwendung**

(57) Neue Myc-bindende Zinkfingerproteine, ihre
Herstellung und ihre Verwendung.

EP 0 875 567 A2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung.

Myc ist ein spezifisch an DNA bindendes Protein. Es wird zur Familie der Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (HLH/LZ)

5 Transkriptionsfaktoren gezählt (Landschulz et al., 1988, Murre et al., 1989). Myc ist ein zentraler Transkriptionsaktivator, der mit dem Protein Max (Amati et al., 1993) einen Komplex bildet und durch diesen molekularen Mechanismus andere Gene aktiviert, beispielsweise alpha-Prothymosingen, Ornithindecarboxylasegen und cdc25A.

Von Schulz et al., 1995, wurde ein 13 Zinkfinger enthaltendes Protein aus der Maus beschrieben, dessen zelluläre Funktion jedoch unklar ist.

10 Aufgrund seiner Schlüsselstellung in der Transkription bietet Myc einen Ansatzpunkt zum Verständnis von zellulären, insbesondere von pathophysiologischen Prozessen.

Es bestand daher die Aufgabe, weitere Informationen über die molekulare Wirkungsweise von Myc, insbesondere über die Myc vermittelte Genrepression bereitzustellen.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz. Dieses Protein besitzt dreizehn Zinkfingerdomänen.

Es weist folgende biologischen Eigenschaften auf:

- Spezifische Bindung an Myc,
- Transaktivierung des Adenovirus Major Late (AdML) Promotors,
- 20 • Transaktivierung des Cyclin D1 Promotors,
- durch Assoziation mit Myc wird die Transaktivierung gehemmt,

in Abwesenheit von Myc ist das Protein im wesentlichen im Cytosol assoziiert mit Mikrotubuli zu finden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine, die sich aus der SEQ ID NO:2 dargestellten Struktur durch 25 Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäuren ableiten lassen, wobei diese Proteine noch die wesentlichen biologischen Eigenschaften des durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Proteins besitzen. Diese Proteine werden im folgenden Mutante genannt. Unter wesentlichen Eigenschaften wird die spezifische Bindung der Mutante an Myc verstanden.

30 Die oben aufgeführten Eigenschaften des durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Proteins müssen nicht alle bei den Mutanten vorhanden sein, solange die spezifische Bindung an Myc gegeben ist. Bevorzugt sind jedoch diejenigen Mutationen, die alle der oben aufgeführten Eigenschaften besitzen.

35 Die Anzahl der durch Insertion Substitution oder Deletion gegenüber dem durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Protein veränderten Aminosäuren kann zwischen 1 und 100, bevorzugt zwischen 1 und 50 Aminosäuren variieren. Die Veränderungen können in einem kleineren Bereich des Moleküls konzentriert oder auch über das ganze Molekül verteilt sein.

Bevorzugte Veränderungen sind konservative Substitutionen, bei denen eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlicher Raumerfüllung, Ladung oder Hydrophilie ersetzt wird.

Beispiele für solche konservativen Substitutionen sind

- 40 Ersatz von Arg durch Lys oder umgekehrt,
- Ersatz von Arg durch His oder umgekehrt,
- Ersatz von Asp durch Glu oder umgekehrt,
- Ersatz von Asn durch Gln oder umgekehrt,
- Ersatz von Cys durch Met oder umgekehrt,
- 45 Ersatz von Cys durch Ser oder umgekehrt,
- Ersatz von Gly durch Ala oder umgekehrt,
- Ersatz von Val durch Leu oder umgekehrt,
- Ersatz von Val durch Ile oder umgekehrt,
- Ersatz von Leu durch Ile oder umgekehrt,
- 50 Ersatz von Phe durch Tyr oder umgekehrt,
- Ersatz von Phe durch Trp oder umgekehrt,
- Ersatz von Ser durch Thr oder umgekehrt.

Die Veränderungen können auch kombiniert werden, z.B. eine oder mehrere Substitutionen mit Deletionen und/oder Insertionen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die oben beschriebenen Proteine codieren. Solche Nukleinsäuresequenzen sind bevorzugt DNA, insbesondere cDNA Sequenzen; in einzelsträngig r oder doppelsträngiger Form.

Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind solche mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz und solche, die mit dieser Sequenz einen hohen Verwandschaftsgrad aufweisen, beispielsweise solche, die für das gleiche Protein codieren wie SEQ ID NO:1. Weitere bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind solche, die für ein Protein codieren, das 95% oder mehr Identität mit dem Protein der Sequenz SEQ ID NO:2 aufweist.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die eine der oben beschriebenen Nukleinsäuresequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einem oder mehreren Regulationselementen tragen. Unter Regulationselementen sind Nukleinsäurefragmente zu verstehen, die auf Transkription oder Translation einen regulierenden Einfluß haben, beispielsweise Promotoren, Enhancer, Polyadenylierungsstellen, ribosomale Bindungsstellen.

10 Die mit solchen Vektoren transformierten Wirtsorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Als Wirtsorganismen geeignet sind Mikroorganismen, pflanzliche oder tierische Zellen oder Lebewesen. Bevorzugte Wirtsorganismen sind eukaryotische Zellen und Lebewesen. Der Begriff Wirtsorganismus umfaßt auch beispielsweise transgene Tiere und Pflanzen.

15 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine erfolgt bevorzugt mit Hilfe gentechnischer Verfahren. Ein Wirtsorganismus, der die Erbinformation für die erfindungsgemäßen Proteine trägt, wird unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des Proteins erlauben. Diese Bedingungen -wie Temperatur, Nährmedium, Zeldichte - hängen weitgehend von der Wahl des Wirtsorganismus ab. Solche Bedingungen sind jedoch dem Fachmann für die einzelnen Wirtsorganismen geläufig.

20 Die exprimierten Proteine werden anschließend, ggf. nach Aufbrechen des Wirtsorganismus, vom Wirtsorganismus abgetrennt und in reiner Form durch bekannte Methoden der Proteinreinigung, wie Fällung, Chromatographie, Elektrophorese in reiner Form isoliert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Proteine als Antigen zur Herstellung von Antikörpern, sowie die so erhaltenen Antikörper. Es lassen sich durch den Fachmann bekannte Verfahren polyklonale Antiseren oder auch monoklonale Antikörper herstellen.

25 Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich auch als Testsysteme zur Auffindung von potentiellen selektiven Transkriptionsmodulierenden Substanzen. Dies läßt sich besonders gut testen, indem man die Fähigkeit der Proteine, mit Myc einen Proteinkomplex zu bilden, ausnützt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Inkubation des Proteins gemäß Anspruch 1 mit dem Genprodukt von myc unter Bedingungen, unter denen sich ein Proteinkomplex zwischen diesen beiden Proteinen ausbildet,
- 30 (b) Inkubation der beiden Proteine unter ansonst gleichen Bedingungen wie (a) jedoch in Anwesenheit einer oder mehrerer Substanzen, die auf spezifische transkriptionsmodulierende Aktivitäten zu testen sind,
- (c) Ermitteln des Unterschiedes in der Proteinkomplexbildung zwischen (b) und (a),
- 35 (d) Auswahl solcher Substanzen, bei denen gemäß Schritt (b) eine andere Proteinkomplexbildung erhalten wurde als bei Schritt (a).

40 Es lassen sich damit Substanzen auffinden, die die Proteinkomplexbildung zwischen den neuen Zinkfingerprotein und Myc fördern, aber auch solche, die sie unterbinden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eignen sich auch zur Gentherapie von Erkrankungen, bei denen die durch Myc vermittelte Transkription gestört ist.

45 Beispielsweise können zusätzliche Gensequenzen eingebracht werden um so die zelluläre Konzentration der Zinkfingerproteine zu erhöhen. Es kann aber auch gewünscht sein, daß die Konzentration der Zinkfingerproteine erniedrigt werden soll. In diesem Falle bietet sich eine Gentherapie auf antisense Basis an, wobei man eine zu dem Zinkfingerprotein komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäurederivat appliziert, und somit die Expression des Zinkfingerproteins reduziert.

Die weitere Ausgestaltung der Erfindung ist in den folgenden Beispielen aufgeführt.

50 Beispiel 1

Isolierung der DNA mit der durch SEQ ID NO:1 beschriebenen Struktur

Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, daß die Integrität der Helix-Loop-Helix Domäne von Myc kritisch für die 55 Genrepression durch Myc in stabilen Zelllinien war (Philipp et al., 1994). Um neue Proteine zu identifizieren, die mit dem C-Terminus von Myc interagieren, wurde ein DNA-Fragment, das für die basische Region und die HLH/LZ Domäne (Aminosäuren 355-439 des humanen Myc) codiert, im Leserahmen an die DNA bindende Domäne von GAL4 (Aminosäur 1-147) fusioniert und als Körder in einem "Two-Hybrid-Screen" (Fields and Song, 1989) benutzt.

2x10⁵ unabhängige Transformanden einer HeLa cDNA Bibliothek, markiert mit der GAL4 Aktivierungsdomäne, wurden gescreent. Ein Clon mit β-Galaktosidaseaktivität wurde weiter charakterisiert. Es wurde keine Interaktion zwischen dem von diesem Clon codierten Protein und der DNA Bindungsdomäne von GAL4 allein oder einer GAL4-BCY-1 Chimäre, die als Negativkontrolle benutzt wurde, festgestellt.

5 Die Interaktion mit Myc wurde aufgehoben durch Deletion der HLH-Domäne in Myc (370-412), nicht aber durch Insertion der vier Aminosäuren zwischen der HLH Domäne und dem Leucin-Zipper (In 412) oder durch Deletion des gesamten Leucin-Zippers (412-434). Eine spezifische Interaktion wurde auch nachgewiesen mit N-Myc aber keine mit MAX oder USF, zwei HLH-Proteinen, die mit Myc nahe verwandt sind.

10 cDNA-Moleküle mit voller Länge wurden durch ein 5'-RACE-Protokoll isoliert und sequenziert (SEQ ID NO:1). Sie codieren ein Protein mit 803 Aminosäuren (SEQ ID NO:2) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 87,970 Dalton. Das Protein wurde Miz-1 für Myc-Interacting-Zincfinger-Protein-1 genannt.

Die Sequenzierung ergab, daß der isolierte Clon für ein Zincfingerprotein mit 13 Zincfingern codierte, 12 davon unmittelbar geclustert in der C-terminalen Hälfte des Proteins.

15 Beispiel 2

Herstellung von Mutanten

Ausgehend von der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz können mit dem Fachmann geläufigen 20 Methoden der Gentechnik Nukleinsäuren hergestellt werden, die für veränderte Proteine (Mutanten) codieren. Die Herstellung der Mutanten selbst erfolgt zweckmäßigerweise durch Expression einer Nukleinsäure in einem geeigneten Wirtsorganismus.

Beispiel 3

25 Assoziation des Proteins SEQ ID NO:2 mit Myc

Der C-Terminus des Proteins SEQ ID NO:2 (Aminosäure 269-803) wurde mit der Glutathion-Transferase (GST) (Smith and Johnson, 1988) fusioniert, das GST-Miz-1 Fusionsprotein gereinigt und mit in vitro synthetisiertem, radioaktiv markiertem Myc Protein inkubiert. Myc assoziiert spezifisch mit GST-Miz-1, jedoch nicht mit GST. Eine Mutante von Myc, der die HLH Domäne fehlt, konnte nicht mit GST-Miz-1 assoziieren. Radioaktiv markiertes Max interagiert weder mit GST-Miz-1 noch mit GST. Jedoch kann mit Hilfe von Myc Max an GST-Miz-1-Kugelchen in vitro binden, was dafür spricht, daß Miz-1 und Max mit unterschiedlichen Flächen der HLH-Domäne von Myc interagieren.

35 Literaturverzeichnis

- Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- Murre, C., SchonleberMcCaw, P., and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Philipp, A., Schneider, A., Västrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of Cyclin D1: a Novel Function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4032-4043.
- Schulz, T. C., Hopwood, B., Rathjen, P. D., and Wells, J. R. (1995). An unusual arrangement of 13 zinc fingers in the vertebrate gene Z13. *Biochem. J.* 311, 219-224.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

5

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

10

(ii) ANMELDETITEL: Myc-bindende Zinkfingerproteine

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

20

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

25

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2680 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

35

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..159

40

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 160..2571

45

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 2572..2680

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGAGTGCCGT CCCCGGCCTT CTCGCGGCCG TGATGCACCT CCCTCTCCGG TGGGGTCCGG

60

GACATGGCAG GTAATGAGCC GGACGGAGGGG AGCCAAGCTG GAGTTTACAC AGGCAAAC TG

120

55

EP 0 875 567 A2

	TCAGAAAAGA GTAGCCTGGG CTGTCTGGAA ATCTGAGCC ATG GAC TTT CCC CAG Met Asp Ph Pro Gln 1 5	174
5	CAC AGC CAG CAT GTC TTG GAA CAG CTG AAC CAG CAG CGG CAG CTG GGG His Ser Gln His Val Leu Glu Gln Leu Asn Gln Gln Arg Gln Leu Gly 10 15 20	222
10	CTT CTC TGT GAC TGC ACC TTT GTG GTG GAC GGT GTT CAC TTT AAG GCT Leu Leu Cys Asp Cys Thr Phe Val Val Asp Gly Val His Phe Lys Ala 25 30 35	270
15	CAT AAA GCA GTG CTG GCG GCC TGC AGC GAG TAC TTC AAG ATG CTC TTC His Lys Ala Val Leu Ala Ala Cys Ser Glu Tyr Phe Lys Met Leu Phe 40 45 50	318
20	GTG GAC CAG AAG GAC GTG GTG CAC CTG GAC ATC AGT AAC GCG GCA GGC Val Asp Gln Lys Asp Val Val His Leu Asp Ile Ser Asn Ala Ala Gly 55 60 65	366
25	CTG GGG CAG ATG CTG GAG TTT ATG TAC ACG GCC AAG CTG AGC CTG AGC Leu Gly Gln Met Leu Glu Phe Met Tyr Thr Ala Lys Leu Ser Leu Ser 70 75 80 85	414
30	CCT GAG AAC GTG GAT GTG CTG GCC GTG GCC ACT TTC CTC CAA ATG Pro Glu Asn Val Asp Asp Val Leu Ala Val Ala Thr Phe Leu Gln Met 90 95 100	462
35	CAG GAC ATC ATC ACG GCC TGC CAT GCC CTC AAG TCA CTT GCT GAG CCG Gln Asp Ile Ile Thr Ala Cys His Ala Leu Lys Ser Leu Ala Glu Pro 105 110 115	510
40	GCT ACC AGC CCT GGG GGA AAT GCG GAG GCC TTG GCC ACA GAA GGA GGG Ala Thr Ser Pro Gly Gly Asn Ala Glu Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly 120 125 130	558
45	GAC AAG AGA GCC AAA GAG GAG AAG GTG GCC ACC AGC ACG CTG AGC AGG Asp Lys Arg Ala Lys Glu Lys Val Ala Thr Ser Thr Leu Ser Arg 135 140 145	606
50	CTG GAG CAG GCA GGA CGC AGC ACA CCC ATA GGC CCC AGC AGG GAC CTC Leu Glu Gln Ala Gly Arg Ser Thr Pro Ile Gly Pro Ser Arg Asp Leu 150 155 160 165	654
55	AAG GAG GAG CGC GGC GGT CAG GCC CAG AGT GCG GCC AGC GGT GCA GAG Lys Glu Glu Arg Gly Gly Gln Ala Gln Ser Ala Ala Ser Gly Ala Glu 170 175 180	702
60	CAG ACA GAG AAA GCC GAT GCG CCC CGG GAG CCG CCG CCT GTG GAG CTC Gln Thr Glu Lys Ala Asp Ala Pro Arg Glu Pro Pro Pro Val Glu Leu 185 190 195	750

EP 0 875 567 A2

	AAG CCA GAC CCC ACG AGT GCC ATG GCT GCC GCA GAA GCT GAG GCC GCT Lys Pro Asp Pro Thr Ser Gly Met Ala Ala Ala Glu Ala Glu Ala Ala	798
5	200 205 210	
	TTG TCC GAG AGC TCG GAG CAA GAA ATG GAG GTG GAG CCC GCC CGG AAA Leu Ser Glu Ser Ser Glu Gln Glu Met Glu Val Glu Pro Ala Arg Lys	846
	215 220 225	
10	GGG GAA GAG GAG CAA AAG GAG CAA GAG GAG CAA GAG GAG GAG GGC GCA Gly Glu Glu Glu Gln Lys Glu Gln Glu Gln Glu Glu Glu Gly Ala	894
	230 235 240 245	
15	GGG CCA GCT GAG GTC AAG GAG GAG GGT TCC CAG CTG GAG AAC GGA GAG Gly Pro Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Ser Gln Leu Glu Asn Gly Glu	942
	250 255 260	
20	GCC CCC GAG GAG AAC GAG AAT GAG GAG TCA GCG GGC ACA GAC TCG GGG Ala Pro Glu Glu Asn Glu Asn Glu Ser Ala Gly Thr Asp Ser Gly	990
	265 270 275	
	CAG GAG CTC GGC TCC GAG GCC CGG GGC CTG CGC TCA GGC ACC TAC GGC Gln Glu Leu Gly Ser Glu Ala Arg Gly Leu Arg Ser Gly Thr Tyr Gly	1038
	280 285 290	
25	GAC CGC ACG GAG TCC AAG GCC TAC GGC TCC GTC ATC CAC AAG TGC GAG Asp Arg Thr Glu Ser Lys Ala Tyr Gly Ser Val Ile His Lys Cys Glu	1086
	295 300 305	
30	GAC TGT GGG AAG GAG TTC ACG CAC ACG GGG AAC TTC AAG CGG CAC ATC Asp Cys Gly Lys Glu Phe Thr His Thr Gly Asn Phe Lys Arg His Ile	1134
	310 315 320 325	
35	CGC ATC CAC ACG GGG GAG AAG CCC TTC TCG TGC CGG GAG TGC AGC AAG Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Glu Cys Ser Lys	1182
	330 335 340	
40	GCC TTT TCC GAC CCG GCC GCG TGC AAG GCC CAT GAG AAG ACG CAC AGC Ala Phe Ser Asp Pro Ala Ala Cys Lys Ala His Glu Lys Thr His Ser	1230
	345 350 355	
	CCT CTG AAG CCC TAC GGC TGC GAG GAG TGC GGG AAG AGC TAC CGC CTC Pro Leu Lys Pro Tyr Gly Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ser Tyr Arg Leu	1278
	360 365 370	
45	ATC AGC CTG CTG AAC CTG CAC AAG AAG CGG CAC TCG GGC GAG GCG CGC Ile Ser Leu Leu Asn Leu His Lys Lys Arg His Ser Gly Glu Ala Arg	1326
	375 380 385	
50	TAC CGC TGC GAG GAC TGC GGC AAG CTC TTC ACC ACC TCG GGC AAC CTC Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Leu Phe Thr Thr Ser Gly Asn Leu	1374
	390 395 400 405	

	AAG CGC CAC CAG CTG GTG CAC AGC GGC GAG AAG CCC TAC CAG TGC GAC Lys Arg His Gln Leu Val His Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp 410 415 420	1422
5	TAC TGC GGC CGC TCC TTC TCC GAC CCC ACT TCC AAG ATG CGC CAC CTG Tyr Cys Gly Arg Ser Phe Ser Asp Pro Thr Ser Lys Met Arg His Leu 425 430 435	1470
10	GAG ACC CAC GAC ACG GAC AAG GAG CAC AAG TGC CCA CAC TGC GAC AAG Glu Thr His Asp Thr Asp Lys Glu His Lys Cys Pro His Cys Asp Lys 440 445 450	1518
15	AAG TTC AAC CAG GTA GGG AAC CTG AAG GCC CAC CTG AAG ATC CAC ATC Lys Phe Asn Gln Val Gly Asn Leu Lys Ala His Leu Lys Ile His Ile 455 460 465	1566
20	GCT GAC GGG CCC CTC AAG TGC CGA GAG TGT GGG AAG CAG TTC ACC ACC Ala Asp Gly Pro Leu Lys Cys Arg Glu Cys Gly Lys Gln Phe Thr Thr 470 475 480 485	1614
	TCA GGG AAC CTG AAG CGG CAA CTT CGG ATC CAC AGC GGG GAG AAG CCC Ser Gly Asn Leu Lys Arg Gln Leu Arg Ile His Ser Gly Glu Lys Pro 490 495 500	1662
25	TAC GTG TGC ATC CAC TGC CAG CGA CAG TTT GCA GAC CCC GGC GCT CTG Tyr Val Cys Ile His Cys Gln Arg Gln Phe Ala Asp Pro Gly Ala Leu 505 510 515	1710
30	CAG CGG CAC GTC CGC ATT CAC ACA GGT GAG AAG CCA TGC CAG TGT GTG Gln Arg His Val Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Cys Gln Cys Val 520 525 530	1758
35	ATG TGC GGT AAG GCC TTC ACC CAG GCC AGC TCC CTC ATC GCC CAC GTG Met Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ala Ser Ser Leu Ile Ala His Val 535 540 545	1806
40	CGC CAG CAC ACC GGG GAG AAG CCC TAC GTC TGC GAG CGC TGC GGC AAG Arg Gln His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys Glu Arg Cys Gly Lys 550 555 560 565	1854
	AGA TTC GTC CAG TCC AGC CAG TTG GCC AAT CAT ATT CGC CAC CAC GAC Arg Phe Val Gln Ser Ser Gln Leu Ala Asn His Ile Arg His His Asp 570 575 580	1902
45	AAC ATC CGC CCA CAC AAG TGC AGC GTG TGC AGC AAG GCC TTC GTG AAC Asn Ile Arg Pro His Lys Cys Ser Val Cys Ser Lys Ala Phe Val Asn 585 590 595	1950
50	GTC GGG GAC CTG TCC AAG CAC ATC ATC ATT CAC ACT GGA GAG AAG CCT Val Gly Asp Leu Ser Lys His Ile Ile His Thr Gly Glu Lys Pro 600 605 610	1998

TAC CTG TGT GAT AAG TGT GGG CGT GGC TTC AAC CGG GTA GAC AAC CTG Tyr Leu Cys Asp Lys Cys Gly Arg Gly Phe Asn Arg Val Asp Asn Leu 615 620 625	2046
5 CGC TCC CAC GTG AAG ACC GTG CAC CAG GGC AAG GCA GGC ATC AAG ATC Arg Ser His Val Lys Thr Val His Gln Gly Lys Ala Gly Ile Lys Ile 630 635 640 645	2094
10 CTG GAG CCC GAG GAG GGC AGT GAG GTC AGC GTG GTC ACT GTG GAT GAC Leu Glu Pro Glu Glu Gly Ser Glu Val Ser Val Val Thr Val Asp Asp 650 655 660	2142
15 ATG GTC ACG CTG GCT ACC GAG GCA CTG GCA GCG ACA GCC GTC ACT CAG Met Val Thr Leu Ala Thr Glu Ala Leu Ala Ala Thr Ala Val Thr Gln 665 670 675	2190
20 CTC ACA GTG GTG CCG GTG GGA GCT GCA GTG ACA GCC GAT GAG ACG GAA Leu Thr Val Val Pro Val Gly Ala Ala Val Thr Ala Asp Glu Thr Glu 680 685 690	2238
25 GTC CTG AAG GCC GAG ATC AGC AAA GCT GTG AAG CAA GTG CAG GAA GAA Val Leu Lys Ala Glu Ile Ser Lys Ala Val Lys Gln Val Gln Glu Glu 695 700 705	2286
30 GAC CCC AAC ACT CAC ATC CTC TAC GCC TGT GAC TCC TGT GGG GAC AAG Asp Pro Asn Thr His Ile Leu Tyr Ala Cys Asp Ser Cys Gly Asp Lys 710 715 720 725	2334
35 TTT CTG GAT GCC AAC AGC CTG GCT CAG CAT GTG CGA ATC CAC ACA GCC Phe Leu Asp Ala Asn Ser Leu Ala Gln His Val Arg Ile His Thr Ala 730 735 740	2382
40 CAG GCA CTG GTC ATG TTC CAG ACA GAC GCG GAC TTC TAT CAG CAG TAT Gln Ala Leu Val Met Phe Gln Thr Asp Ala Asp Phe Tyr Gln Gln Tyr 745 750 755	2430
45 GGG CCA GGT GGC ACG TGG CCT GCC GGG CAG GTG CTG CAG GCT GGG GAG Gly Pro Gly Gly Trp Pro Ala Gly Gln Val Leu Gln Ala Gly Glu 760 765 770	2478
50 CTG GTC TTC CGC CCT CGC GAC GGG GCT GAG GGC CAG CCC GCA CTG GCA Leu Val Phe Arg Pro Arg Asp Gly Ala Glu Gly Gln Pro Ala Leu Ala 775 780 785	2526
GAG ACC TCC CCT ACA CCT CCT GAA TGT CCC CCG CCT GCC GAG TGAGCTGGCG Glu Thr Ser Pro Thr Pro Pro Glu Cys Pro Pro Pro Ala Glu 790 795 800	2578
GCCCTTCTGA CTGTTTATT AAGGATGGAT GGCACCCCTGG AACCGGGAAAG GGTGGCCTGT	2638
55 TCCCTAGAGA GAATAAATTG GATTATTTTC TAAAAAAA AA	2680

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 803 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10

Met	Asp	Phe	Pro	Gln	His	Ser	Gln	His	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Asn	Gln
1									10					15	

15

Gln	Arg	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Asp	Cys	Thr	Phe	Val	Val	Asp	Gly
									25				30		

20

Val	His	Phe	Lys	Ala	His	Lys	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Cys	Ser	Glu	Tyr
									40			45			

25

Phe	Lys	Met	Leu	Phe	Val	Asp	Gln	Lys	Asp	Val	Val	His	Leu	Asp	Ile
									55			60			

30

Ser	Asn	Ala	Ala	Gly	Leu	Gly	Gln	Met	Leu	Glu	Phe	Met	Tyr	Thr	Ala
									70			75		80	

35

Lys	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Asn	Val	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Val	Ala
									85			90		95	

40

Thr	Phe	Leu	Gln	Met	Gln	Asp	Ile	Ile	Thr	Ala	Cys	His	Ala	Leu	Lys
								100			105		110		

45

Ser	Leu	Ala	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Asn	Ala	Glu	Ala	Leu
								115			120		125		

50

Ala	Thr	Glu	Gly	Asp	Lys	Arg	Ala	Lys	Glu	Glu	Lys	Val	Ala	Thr	
								130			135		140		

55

Ser	Thr	Leu	Ser	Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	Gly	Arg	Ser	Thr	Pro	Ile	Gly
								145			150		155		160

60

Pro	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Glu	Glu	Arg	Gly	Gly	Gln	Ala	Gln	Ser	Ala
								165			170		175		

65

Ala	Ser	Gly	Ala	Glu	Gln	Thr	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Pro	Arg	Glu	Pro
								180			185		190		

70

Pro	Pro	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	Asp	Pro	Thr	Ser	Gly	Met	Ala	Ala	Ala
								195			200		205		

75

Glu	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Ser	Ser	Glu	Gln	Glu	Met	Glu	Val
								210			215		220		

80

Glu	Pro	Ala	Arg	Lys	Gly	Glu	Glu	Gln	Lys	Glu	Gln	Glu	Glu	Gln	
								225			230		235		240

85

EP 0875 567 A2

	Glu Glu Glu Gly Ala Gly Pro Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Ser Gln			
	245	250	255	
5	Leu Glu Asn Gly Glu Ala Pro Glu Glu Asn Glu Glu Ser Ala			
	260	265	270	
	Gly Thr Asp Ser Gly Gln Glu Leu Gly Ser Glu Ala Arg Gly Leu Arg			
	275	280	285	
10	Ser Gly Thr Tyr Gly Asp Arg Thr Glu Ser Lys Ala Tyr Gly Ser Val			
	290	295	300	
	Ile His Lys Cys Glu Asp Cys Gly Lys Glu Phe Thr His Thr Gly Asn			
15	305	310	315	320
	Phe Lys Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys			
	325	330	335	
20	Arg Glu Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asp Pro Ala Ala Cys Lys Ala His			
	340	345	350	
	Glu Lys Thr His Ser Pro Leu Lys Pro Tyr Gly Cys Glu Glu Cys Gly			
	355	360	365	
25	Lys Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Leu Leu Asn Leu His Lys Lys Arg His			
	370	375	380	
	Ser Gly Glu Ala Arg Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Leu Phe Thr			
30	385	390	395	400
	Thr Ser Gly Asn Leu Lys Arg His Gln Leu Val His Ser Gly Glu Lys			
	405	410	415	
35	Pro Tyr Gln Cys Asp Tyr Cys Gly Arg Ser Phe Ser Asp Pro Thr Ser			
	420	425	430	
	Lys Met Arg His Leu Glu Thr His Asp Thr Asp Lys Glu His Lys Cys			
	435	440	445	
40	Pro His Cys Asp Lys Lys Phe Asn Gln Val Gly Asn Leu Lys Ala His			
	450	455	460	
	Leu Lys Ile His Ile Ala Asp Gly Pro Leu Lys Cys Arg Glu Cys Gly			
	465	470	475	480
45	Lys Gln Phe Thr Thr Ser Gly Asn Leu Lys Arg Gln Leu Arg Ile His			
	485	490	495	
	Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys Ile His Cys Gln Arg Gln Phe Ala			
50	500	505	510	
	Asp Pro Gly Ala Leu Gln Arg His Val Arg Ile His Thr Gly Glu Lys			
	515	520	525	

Pro Cys Gln Cys Val Met Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ala Ser Ser
 530 535 540
 5 Leu Ile Ala His Val Arg Gln His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys
 545 550 555 560
 Glu Arg Cys Gly Lys Arg Phe Val Gln Ser Ser Gln Leu Ala Asn His
 565 570 575
 10 Ile Arg His His Asp Asn Ile Arg Pro His Lys Cys Ser Val Cys Ser
 580 585 590
 Lys Ala Phe Val Asn Val Gly Asp Leu Ser Lys His Ile Ile Ile His
 15 595 600 605
 Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Leu Cys Asp Lys Cys Gly Arg Gly Phe Asn
 610 615 620
 20 Arg Val Asp Asn Leu Arg Ser His Val Lys Thr Val His Gln Gly Lys
 625 630 635 640
 Ala Gly Ile Lys Ile Leu Glu Pro Glu Glu Gly Ser Glu Val Ser Val
 645 650 655
 25 Val Thr Val Asp Asp Met Val Thr Leu Ala Thr Glu Ala Leu Ala Ala
 660 665 670
 Thr Ala Val Thr Gln Leu Thr Val Val Pro Val Gly Ala Ala Val Thr
 30 675 680 685
 Ala Asp Glu Thr Glu Val Leu Lys Ala Glu Ile Ser Lys Ala Val Lys
 690 695 700
 35 Gln Val Gln Glu Glu Asp Pro Asn Thr His Ile Leu Tyr Ala Cys Asp
 705 710 715 720
 Ser Cys Gly Asp Lys Phe Leu Asp Ala Asn Ser Leu Ala Gln His Val
 725 730 735
 40 Arg Ile His Thr Ala Gln Ala Leu Val Met Phe Gln Thr Asp Ala Asp
 740 745 750
 Phe Tyr Gln Gln Tyr Gly Pro Gly Gly Thr Trp Pro Ala Gly Gln Val
 45 755 760 765
 Leu Gln Ala Gly Glu Leu Val Phe Arg Pro Arg Asp Gly Ala Glu Gly
 770 775 780
 50 Gln Pro Ala Leu Ala Glu Thr Ser Pro Thr Pro Pro Glu Cys Pro Pro
 785 790 795 800
 Pro Ala Glu

Patentansprüche

1. Isoliertes Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz sowie die daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältlichen Mutante, die noch die wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins besitzen.
5
2. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.
3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 1.
10
4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das mindestens 95 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz besitzt.
5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO:1 dargestellte Struktur besitzt.
15
6. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 - 5, funktionell verknüpft mit mindestens einem Regulationselement.
- 20 7. Wirtsorganismus, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3.
8. Wirtsorganismus, transformiert mit einem Vektor gemäß Anspruch 6.
9. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Wirtsorganismus gemäß Anspruch 6 unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des Proteins erlauben und anschließend das exprimierte Protein vom Wirtsorganismus abtrennt und in reiner Form isoliert.
25
10. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1 zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen.
30
11. Verfahren zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen, das folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Inkubation des Proteins gemäß Anspruch 1 mit dem Genprodukt von myc unter Bedingungen, unter denen sich ein Proteinkomplex zwischen diesen beiden Proteinen ausbildet,
35
 - (b) Inkubation der beiden Proteine unter ansonst gleichen Bedingungen wie (a) jedoch in Anwesenheit einer oder mehrerer Substanzen, die auf spezifische transkriptionsmodulierende Aktivitäten zu testen sind,
 - (c) Ermitteln des Unterschiedes in der Proteinkomplexbildung zwischen (b) und (a),
40
 - (d) Auswahl solcher Substanzen, bei denen gemäß Schritt (b) eine andere Proteinkomplexbildung erhalten wurde als bei Schritt (a).
- 45 12. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1 als Antigen zur Herstellung von spezifischen Antikörpern.
13. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3 zur Gentherapie.
14. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
50
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man durch die exogen zugeführte Nukleinsäuresequenz die zelluläre Konzentration des Proteins gemäß Anspruch 1 erhöht oder erniedrigt.



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 875 567 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
22.12.1999 Patentblatt 1999/51

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/12, C07K 14/47,
C12N 15/63, C12N 1/21,
G01N 33/68, C07K 16/18,
A61K 48/00

(43) Veröffentlichungstag A2:
04.11.1998 Patentblatt 1998/45

(21) Anmeldenummer: 98106426.4

(22) Anmeldetag: 08.04.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 30.04.1997 DE 19718249

(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:

- Peukert, Karen
35094 Lahntal-Sterzhausen (DE)
- Haenel, Frank, Dr.
07745 Jena (DE)
- Ellers, Martin, Prof. Dr.
35043 Marburg-Cappel (DE)

(54) Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung

(57) Myc-bindende Zinkfingerproteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung.

EP 0 875 567 A3



Europäisches **EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT**
 Patentamt der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
 übereinkommens für das weitere Verfahren als
 europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 98 10 6426

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D, X	THOMAS C. SCHULZ ET AL.: "An unusual arrangement of 13 zinc fingers in the vertebrate gene Z13" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 311, Nr. 1, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 219-224, XP002117525 * das ganze Dokument *	1-3, 6-10, 12-15	C12N15/12 C07K14/47 C12N15/63 C12N1/21 G01N33/68 C07K16/18 A61K48/00
X	N. TOMMERUP ET AL.: "Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders" GENOMICS, Bd. 27, Nr. 2, 20. Mai 1995 (1995-05-20), Seiten 259-264, XP002117526 * Zusammenfassung; Tabelle 1 * -& R59u022 Datenbank Hs20647 Zugriffssnummer U20647; 6 März 1995 TOMMRUP N. ET AL.: "Human zinc finger protein (ZNF151) mRNA, partial cds." XP002117530 ---	1-3, 6-10, 12-15	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C12N C07K G01N A61K
		-/-	
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Obwohl die Ansprüche 12-15 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	5. Oktober 1999	Montero Lopez, B	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 98 10 6426

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kenzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
D,A	ANGELIKA PHILIPP ET AL.: "Repression of Cyclin D1: a novel function of MYC" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 14, Nr. 6, Juni 1994 (1994-06), Seiten 4032-4043, XP002117527 * Zusammenfassung * * Seite 4039, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 4041, rechte Spalte, letzter Absatz *	1-15	
P,X	PEUKERT K ET AL: "An alternative pathway for gene regulation by Myc." EMBO JOURNAL, (1997 SEP 15) 16 (18) 5672-86., XP002117528 * das ganze Dokument *	1-15	
P,X	SCHNEIDER A ET AL: "Association of Myc with the zinc-finger protein Miz -1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc." CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, (1997) 224 137-46., XP002117529 * das ganze Dokument *	1-15	